

病的状態におけるアストロサイト型グルタミン酸トランスポーター GLT-1の細胞膜発現調節機構

Membrane trafficking of the glial glutamate transporter GLT-1 in the pathological state

吉谷 文 (Fumi Yoshitani)

指導：木村 一郎

<序論>

グルタミン酸は中枢神経における主要な興奮性神経伝達物質である。過剰なグルタミン酸による神経興奮毒性は脳虚血、てんかん、神経変性疾患等、種々の神経疾患における神経細胞脱落の機序として注目されてきた。Na⁺依存性高親和性グルタミン酸トランスポーターは、シナプス後膜上やアストロサイトに存在し、細胞外グルタミン酸を細胞内へ取込むことで興奮性神経伝達を終結させる働きがある。現在までに5種類のサブタイプ (GLAST、GLT-1、EAAC1、EAAT4、EAAT5) が同定されており、特にアストロサイト型の GLT-1 については興奮毒性を防ぐ役割が強調されてきた。また、GLT-1 に関して membrane trafficking によるグルタミン酸取り込みの調節とその関連因子が多数報告されている。しかし、病的状態での細胞内局在変化に関しては未だ不明な点が多い。本研究では病的状態における GLT-1 の細胞膜発現調節機構を解明するため、アストロサイト初代培養系を用いて dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) 誘導性機能的アストロサイトの作製法を確立し、種々の病的条件下での GLT-1 の局在と機能をアストロサイト及び COS7 細胞への GLT-1 遺伝子導入を用いたタイムラプスイメージングで解析した。さらに高カリウム条件下で細胞内局在に影響を与える薬物を用いて GLT-1 の細胞膜発現調節分子の同定を試みた。

<実験方法・実験材料>

生後1日目の C57BL/6J マウスを用いて大脳皮質アストロサイトの初代培養を行い、①dbcAMP 添加の効果、②種々の病的状態(高グルタミン酸、高カリウム、低ナトリウム、乳酸アシドーシス、低酸素)における GLT-1 の局在と機能、③高カリウム条件下における GLT-1 細胞膜発現調節分子を調べるために、3H-グルタミン酸の取り込み測定、細胞膜のビオチン化及びウェスタンブロットティング、免疫細胞化学染色を行った。また、green fluorescent protein(GFP)付加型 GLT-1 遺伝子を導入した COS7 細胞を用いてタイムラプスイメージングを撮影し GLT-1 の細胞内局在変化をリアルタイムで観察した。

<実験結果・考察>

初代培養アストロサイトにおいて dbcAMP の効果を検討したところ、dbcAMP 添加でグルタミン酸取り込みが増加

し、GLAST と GLT-1 のタンパク質発現及び細胞膜上での発現増加が確認された。また蛍光免疫細胞化学染色においても同様に GLT-1 の細胞膜発現増加が観察され、従来の報告と一致していた。

種々の病的条件下における GLT-1 の局在と機能を検討したところ、細胞浮腫を生じる高カリウム条件下でグルタミン酸取り込みの減少と GLT-1 の内在化が確認された。COS7 細胞を用いたタイムラプスイメージングにおいても、暴露後40分以内に GLT-1 が核周囲に急速に移動しており、この積極的な内在化により逆トランスポートを防ぐことで細胞死を軽減させる可能性が考えられた。低ナトリウム条件下でも同様の傾向が観察され、従来いわれている低ナトリウムによるグルタミン酸取り込み機能抑制に GLT-1 の内在化が関与している可能性が示唆された。高グルタミン酸ではグルタミン酸取り込みが増加傾向にあり、細胞膜への移動が促進された。低酸素では、グルタミン酸取り込みと GLT-1 の細胞膜発現の減少及び細胞質全体に GLT-1 の顆粒状の集合体形成が確認され、この集合体形成が機能調節に関与している可能性が示唆された。

高カリウム条件下における GLT-1 の細胞膜発現調節分子を調べた結果、グルタミン酸取り込み及び細胞膜発現は PI3K 活性化作用を持つ PDGF-BB では増加傾向にあり、PI3K 阻害作用を持つ wortmannin で減少した。PKC 及び PKA の活性変化には影響されず、病的状態において PI3K が GLT-1 の主要な細胞膜発現調節分子であることが示唆された。

以上の結果より、高カリウム条件下で GLT-1 は核付近に急速に内在化し、病的状態においては PI3K が主に GLT-1 の細胞膜発現を調節していることが判明した。また、本研究では低酸素でグルタミン酸の取り込み減少及び GLT-1 の集合体形成が確認され、病的状態において GLT-1 が細胞内小器官へ集合することで、グルタミン酸取り込み機能を調節している、あるいは、GLT-1 が細胞膜上以外で積極的に新たな役割を担っている可能性が示唆された。今後、同様の手法を用いて低ナトリウム及び低酸素状態における GLT-1 の細胞膜発現調節分子を同定し、種々の病的状態における GLT-1 の membrane trafficking の意義を明らかにしていきたい。